

KOIRAN SPERMAN LAATU

KIRJALLISUUSKATSAUS

ELK Annika Kuronen

Lisensiaatintutkielma
Kotieläinten lisääntymistiede
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Annika Kuronen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Koiran sperman laatu			
Oppiaine - Läroämne - Subject Eläinlääketiede			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatintutkielma		Aika - Datum - Month and year 05/2019	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 34
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Lisensiaatintyöni on kirjallisuuskatsaus koiran sperman laadusta. Työn tarkoituksena oli tehdä kokoava katsaus koiran sperman laadusta, laatuun vaikuttavista tekijöistä sekä sperman jäädyttämisestä ja pakastamisesta. Työssä on käyty läpi sperman normaali rakenne sekä uroksen sairaudet ja rakenteelliset viat, jotka aiheuttavat hedelmällisyysongelmia. Työ tehtiin, koska aihetta ei ole tietojemme mukaan aikaisemmin koottu yksien kansien väliin. Sperman viat käsitellään lisääntymistieteiden opinnoissa pintapuolisesti, vaikka aihetta on tutkittu runsaasti. Koska aihe on melko laaja, aiheen kokoaminen yhteen helpottaa lisätietojen etsimistä.</p> <p>Uroskoiran hedelmällisyysongelmat voivat olla alidiagnosoituja. Hedelmällisyysongelmissa saatetaan helposti syyttää vain epäonnistunutta astutusta. Kuitenkin tiedetään, että puolet epäonnistuneista tiinehtymisyrityksistä johtuu uroksesta. Uroskoirilla hedelmällisyyttä heikentävät monet eri tekijät. Näitä ovat esimerkiksi siittiöiden rakenneviat tai siittiöiden puuttuminen spermasta sekä jotkin ulkopuoliset syyt, kuten kivistulehdus ja immunologiset syyt.</p> <p>Kun koiran spermaa pakastetaan tai jäädytetään, se tulisi aina tutkia. Tutkimuksessa tulee selvittää sperman siittiöiheys, siittiöiden kokonaismäärä, siittiöiden kokonaisliikkuvuus, progressiivinen liikkuvuus ja siittiöiden rakenteelliset viat. Ihmisillä siittiöiden rakennevikojen ajatellaan korreloivan merkittävästi hedelmällisyyden kanssa. Kirjallisuuskatsauksessa koottiin tutkimuksista ja artikkeleista arvoja, joiden perusteella sperman laatu voidaan luokitella. Tässä työssä käsitellään laajasti hedelmättömyyden mahdollisia syitä sekä tapoja, joilla siittiöiden laatua voitaisiin parantaa.</p> <p>Sperman normaali ulkonäkö on vaalean harmaan väristä ja hyvässä näytteessä spermarikasta fraktiota saadaan 0,1-3 ml. Koiran spermassa siittiöiden liikkuminen on tehokasta ja eteenpäin vievää ja normaalisti liikkuvia on 70 % siittiöistä. Siittiön normaalissa rakenteessa erottuvat pää-, keski- ja häntäosa. Rakenteellisia vikoja on yhdessä ejakulaatissa 5-15 %. Määrällisesti siittiöitä on yhdessä ejakulaatissa 300-2000x10⁶ siittiötä.</p> <p>Tutkimuksessa käsitellään myös sperman jäädytystä ja pakastusta teoriassa sekä hyvän laimennusnesteen valintaa. Sperman pakastukseen liittyy useita ongelmia. Merkittävin ongelma on siittiöiden kuoleminen pakastuksen yhteydessä. Muita ongelmia ovat esimerkiksi jääkideiden muodostuminen ja kryokapasitaatio. Työssä käydään läpi menetelmiä, joilla voidaan vähentää kuolleiden siittiöiden määrää pakastusprosessissa. Yksi menetelmä on esimerkiksi kaksivaiheinen sperman jäädytys.</p> <p>Noin 40-50 % siittiöistä ei selviä pakastuksesta, vaikka se olisi tehty protokollaa noudattaen. Pakastaminen vähentää siittiöiden kokonaisliikkuvuutta ja lisää rakenteellisia vikoja. Kylmäsäilytetty sperma säilyy hyvin ja usein siittiöitä kuolee vain vähän käsittelyn aikana.</p> <p>Toiveena on, että tämän katsauksen avulla uroksen hedelmällisyysongelmat on helpompi kohdata praktiikassa ja tapauksien lähestyminen yksinkertaistuu. Myös hedelmällisyysongelmien yksityiskohtien ja kokonaiskuvan tarkastelu helpottuu. Katsaus antaa johdonmukaisen ohjeistuksen uroskoiran hedelmällisyysongelmissa yleistutkimuksen teosta sperman laadun arviointiin.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Koiran sperma, siittiö, hedelmällisyys, lisääntymisongelmat, pakastus, jäädytys, laimennusneste,			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s) Työnohjaaja: Tuire Tamminen Työnjohtaja: Juhani Taponen			

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO.....	1
2	SIITTIÖTUOTANTO	2
3	SPERMA	3
3.1	Siittiön rakenne	3
3.2	Seminaaliplasma	4
4	SPERMAN KERÄYS.....	4
5	SPERMAN LAADUN ARVIOINTI	6
5.1	Esitiedot.....	6
5.2	Liikkuvuus (motiliteetti)	7
5.3	Tiheys	8
5.4	Kokonaissiittiömäärä.....	8
5.5	Rakenteelliset viat (morfologia).....	9
5.6	Sytologia	13
5.7	pH	13
5.8	Laadun arviointiin vaikuttavat tekijät	14
6	MUITA TUTKIMUSMENETELMIÄ	15
6.1	Fluoresoiva värjäys.....	15
6.1.1	NucleoCounter	15
6.2	CASA	15
6.3	Sperm Quality Analyzer (SQA).....	16
6.4	Sukupuolilajiteltu sperma	16
7	MUITA HEDELMÄLLISYYTEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	17
7.1	Uroksesta johtuvat viat	17
7.2	<i>Brucella canis</i>	18
7.3	Muita patogeeneja	19

7.4	Ravintolisät.....	21
7.4.1	Rasvahappovalmisteet.....	21
7.4.2	Vitamiinit ja hivenaineet.....	22
7.5	Hormonit.....	23
7.6	Genetiikka	24
8	LAIMENNUSNESTEET	26
9	JÄÄHDYTYS.....	27
9.1	Sperman jäähdytys siirtoa varten	27
9.2	Sperman pakastus säilytystä varten.....	28
9.3	Säilytys ja säilyvyys.....	29
9.4	Sulatus.....	30
10	JÄÄHDYTYKSEN SEKÄ PAKASTUKSEN JA SULATUKSEN VAIKUTUS SPERMAN LAATUUN	30
11	POHDINTA.....	31
12	LÄHTEET	35

1 JOHDANTO

Koiran lisääntymiskyky on hyvä, mutta eroja rotujen välillä kuitenkin löytyy. Rotukohtaisiin lisääntymiseen liittyviin eroavaisuuksiin vaikuttavat muun muassa yhdistelmän sisäsiittoisuus ja ihmisen jalostusvalinnat, joilla ohjataan rakenteellisia ja libidoon vaikuttavia ominaisuuksia.

Koirien keinosiementäminen on yleistynyt maailmanlaajuisesti. Pakastettua spermaa on helppo kuljettaa lähes minne vain. Keinosiemennyksen kysyntä on kasvanut koko maailmassa. Tällä hetkellä Suomessa keinosiennetään yli 500 koiraa vuodessa.

Tiinehtymisen epäonnistumisesta syytetään helposti vain narttua. Uroksen hedelmällisyysongelmat saattavat olla alidiagnosoituja, sillä muun muassa sperman laadun tutkiminen vaatii asiaan perehtyneisyyttä. Ihmisillä tehtyjen tutkimusten perusteella on arvioitu, että noin puolet hedelmällisyshäiriöistä johtuu miehen hedelmättömyydestä. Hedelmättömyyden syy jää kuitenkin usein epäselväksi. Jotta hedelmättömyyttä voitaisiin hoitaa, täytyy pyrkiä selvittämään taustalla oleva syy.

Uroksen sukusolut ovat helpommin tutkittavissa kuin nartun. Sperman tutkiminen antaa hyvän yleiskuvan uroksen hedelmällisyydestä. Yksi tapa selvittää hedelmällisyyttä on laskea tiinehtyneiden narttujen määrä astutettuja narttuja kohti. Tämä kertoo kuitenkin enemmän nartun kuin uroksen hedelmällisyydestä (Eilts 2005). Varmin tieto uroksen hedelmällisyydestä saadaan kuitenkin siementämällä narttuja sen spermalla (Kolster 2018).

Työn tarkoituksena on selvittää koiran sperman laatua sekä tekijöitä, jotka siihen vaikuttavat, laadun kriteereitä sekä tutkimuksia, joita aiheesta on tehty. Kootuista materiaaleista rakennetaan kattava tiedosto, josta on helppo löytää oikeaoppista tietoa hedelmällisyysongelmien diagnosoinnista ja ohjeet koiran sperman käsittelyyn.

2 SIITTIÖTUOTANTO

Siittiötuotanto tapahtuu uroksen kiveksissä. Kivekset rakentuvat välikudoksesta ja siementiehyistä. Leydigin solut sijaitsevat kiveksen välikudoksessa. Välikudoksessa on myös kiveksen veri- ja imusuonet sekä makrofageja, mastsoluja, fibroblasteja ja lymfosyyttejä (Toppari & Huhtaniemi 1999). Välikudos sijaitsee nimensä mukaisesti siementiehyiden välissä. Leydigin solujen tehtävä on tuottaa testosteronia. Testosteronin avulla saadaan aikaan spermatogeneesi eli siittiösolujen kehittyminen. Siementiehyt rakentuu Sertolin soluista, itusoluista ja myoidisoluista (Toppari & Huhtaniemi 1999). Sertolin solut määräävät spermatogeenin aktivoitumisesta reseptoriensa avulla ja tukevat siittiön kehitystä (Senger 2003).

Spermatogeneesi tapahtuu siementiehyiden epiteelissä. Spermatogeneesi jaotellaan kolmeen vaiheeseen. Ensimmäinen vaihe on runsaan lisääntymisen (proliferaation) vaihe, jolloin soluja tuotetaan runsaasti sekä epäkelpoja soluja kuolee. Tämän jälkeen on vuorossa sukusolujen tumanjakautuminen (meioosi), jossa syntyy haploidisia sukusoluja. Myös geneettinen monimuotoisuus lisääntyy meiosisin aikana. Tästä on esimerkkinä kromatidien pariutumisen sekä tekijäinvaihdunta kromatidien välillä. Viimeisenä vuorossa on erilaistumisvaihe, jonka aikana siittiö saa lopullisen muotonsa (Senger 2003). Siittiöiden kehitysmuotoja kutsutaan eri nimillä riippuen siitä, missä vaiheessa kehitystä ne ovat (spermatogonia, spermatosyytti, spermatidi). Spermatideja aletaan kutsua siittiöiksi, kun ne irtoavat siemenepiteelistä (Toppari & Huhtaniemi 1999).

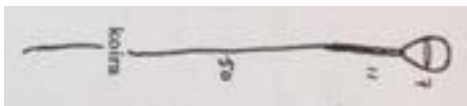
Siementiehyiden neste liikuttaa siittiöt siementiehyiden keskusontelosta kohti kivesverkkoa (rete testis) siemenepiteelistä irtoamisen jälkeen. Kivesverkko kuljettaa siittiöt kypsymään lisäkivekseen (O'Donnell ym. 2011). Siittiön liikkumiskyky kehittyy myös lopullisesti lisäkiveksissä (Toppari & Huhtaniemi 1999). Ilman tätä vaihetta siittiö ei kykene hedelmöittämään munasolua (Senger 2003).

Kiveksillä on valtava potentiaali tehdä siittiösoluja. Nisäkkäillä siittiösolujen päivätuotanto vaihtelee alle yhden ja 25 miljardin siittiön välillä. Tämä tarkoittaa jopa 35 000-200 000 solun tuottamista sekunnissa (Senger 2003).

Koiralla sperman ja siittiöiden määrään vaikuttaa merkittävästi koiran koko. Pieni koira tuottaa spermaa vähemmän ja siittiömäärät ovat pienempiä. Iällä ei ole merkittävää vaikutusta sperman määrään, siittiöiden määrään tai liikkuvuuteen. Sen sijaan iän myötä rakenteellisesti viallisten, kypsien siittiöiden määrä suurenee (Rijsselaere ym. 2007, Tesi ym. 2018). Tesi ym. (2018) totesivat tutkimuksessaan, että ikään liittyvät siittiön rakenteelliset viat ovat yleensä keskiosan muutoksia (proksimaalinen pisara, distaalinen sytoplasman pisara ja muut keskiosan rakenteelliset viat).

3 SPERMA

3.1 Siittiön rakenne



Kuva 1 Koiran normaali siittiön rakenne

Uroseläimen sukusolu, siittiö, rakentuu päästä ja hännästä (Senger 2003). Kuvasta 1 on nähtävissä siittiön normaali rakenne (Eläinlääketieteellisen tiedekunnan opetusmateriaali). Siittiö on elimistön erilaisistunein solu (Toppari & Huhtaniemi 1999).

Siittiön pää koostuu tumasta, akrosomista ja postakrosomaalisesta tupesta. Akrosomi sisältää entsyymejä, jotka mahdollistavat siittiön tunkeutumisen munasoluun. Akrosomi peittää noin kaksi kolmasosaa siittiön päästä, loppuosa on postakrosomaalisen tupin peittämää. Geneettistä perimää kuljettaa siittiön pään sisällä suojassa oleva tuma (Senger 2003).

Siittiön häntä rakentuu keskiosasta sekä hännän pääasiallisesta ja päätekappaleesta. Keskiosa on merkittävä osa siittiötä, sillä se sisältää mitokondrioita, jotka tuottavat liikkumiseen vaadittavaa energiaa. Häntä rakentuu mikrotubuluksista. Mikrotubulukset saavat aikaan hännän liikkeen (Senger 2003).

3.2 Seminaaliplasma

Koiran sperma koostuu siittiöistä ja seminaaliplasmasta. Seminaaliplasma on nestettä, jota tuotetaan pääasiallisesti lisäkiveksessä ja eturauhasessa. Seminaaliplasmalla ei ole merkitystä munasolun hedelmöittämisen kanssa, mutta se on tärkeä osa luonnollista lisääntymistä. Seminaaliplasma ravitsee siittiöitä ja edesauttaa siittiöiden siirtymistä vaginasta kohtuun (Senger 2003).

Seminaaliplasma rakentuu proteiineista, aminohapoista, entsyymeistä, fruktoosista, rasvoista, mineraaleista ja hivenaineista (Kasimanickam ym. 2019). Siittiö käyttää pääsääntöisenä energianlähteenään fruktoosia. Muiden materiaalien tarkoitusta ei tarkkaan tunneta (Senger 2003).

Kasimanickam ym. (2019) tutkimuksessa arvioitiin Holstein-rotuisten sonnien seminaaliplasman proteiineja ja proteiineihin liittyviä eroja niiden sonnien välillä, jotka saivat aikaan keskivertoa enemmän tiineyksiä ja keskivertoa vähemmän tiineyksiä. Tutkimus osoitti, että tietyt proteiinit olivat yhteydessä hedelmällisyyteen ja toiset taas laskivat hedelmällisyyttä. Osa seminaaliplasman proteiineista vaikutasi tukevan oikeahetkistä kapasitaatiota eli siittiön kypsymistä.

4 SPERMAN KERÄYS

Uroskoiran spermaa voidaan kerätä käsin stimuloimalla, keinovaginan avulla, elektroejakulaatiolla (Kutzler 2005) tai lisäkiveksistä aspiroimalla (Varesi ym. 2012). Yleensä koiralta kerätään sperma käsin stimuloimalla (Kutzler 2005). Elektroejakulaatiossa koiralta kerätään spermaa nukutuksen aikana. Elektrodi asetetaan peräsuoleen koiralle, jolta sperma kerätään. Elektrodi lähettää voimistuvia sähköstimuluksia, kunnes koira ejakuloi (Ohl ym. 1994). Sperman keräys elektroejakulaatiolla kielletään epäsuorasti eläinsuojelulajissa (247/1996 7 §). Uudessa eläinsuojelulaissa toimenpide tullaan mahdollisesti kieltämään täysin. Ohl ym. (1994) mukaan elektroejakulaatiolla kerätyn sperman siittiömäärä ja liikkuvuus ovat huonompia verrattaessa keinovaginalla kerättyyn. Siittiöiden määrä ja liikkuvuus

pysyvät kuitenkin tarpeeksi hyvinä hedelmöittymisen kannalta (Kutzler 2005). Lisäkiveksistä aspiroiminen tapahtuu koiran ollessa nukutuksessa. Lisäkives etsitään sormin ja lisäkiveksen hännästä aspiroidaan siittiöitä. Tässä menetelmässä siittiöiden määrä on vähäinen. Ihmisillä tätä menetelmää käytetään keinoputkihedelmöityksessä (Varesi ym. 2012).

Koiran ejakulaatio tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä fraktiossa neste on peräisin pääasiassa eturauhasesta. Se on väriltään kirkasta tai hieman harmahtavaa (Freshman 2002) ja määrällisesti sitä tuotetaan 0,1-2 ml (England ym. 1990). Toinen fraktio on siittiöitä sisältävää ja väriltään valkoista. Toinen fraktio on peräisin lisäkiveksen hännästä, jossa siittiöitä varastoidaan (Freshman 2002). Määrällisesti toista fraktiota tuotetaan 0,1-3 ml (England ym. 1990). Kolmas fraktio tulee aktiivisen astumisen jälkeisessä vaiheessa. Sitä tuotetaan, kuten ensimmäistäkin fraktiota, eturauhasessa. Kolmas fraktio on normaalisti kirkasta ja sitä saadaan useita millilitroja (Freshman 2002), jopa 20 millilitraan asti (England ym. 1990). Ensimmäinen ja toinen fraktio kerätään usein yhdessä, sillä ensimmäisen fraktion määrä on usein hyvin pieni. Jos koiran sperma pakastetaan, tulee fraktiot erotella. Kolmatta fraktiota tulee kerätä sen verran, että siitä saadaan tehtyä kaikki tarvittavat tutkimukset (Freshman 2002). Lisäksi kolmatta fraktiota voidaan käyttää hyödyksi tehtäessä keinosiemennystä vaginaan. Tällöin kolmatta fraktiota tulisi ottaa talteen 2-10 ml (Linde-Forsberg 1995). England & Allen (1992) tutkivat ensimmäisen ja kolmannen fraktion vaikutusta sperman liikkuvuuteen. Spermaa säilytettiin 37 asteen lämpötilassa, suljetussa putkessa. Verrokkeina käytettiin spermaa, johon oli sekoitettu laimennusnestettä. Sperman liikkuvuus laski merkittävästi kahdessa tunnissa, kun siihen oli sekoitettu ensimmäistä ja kolmatta fraktiota.

Sperman keräys uroskoirilta tehdään tavallisesti keinosiemennyksen takia, sperman pakastamiseksi tai sperman laadun tutkimiseksi. Spermaa kerätään uroskoirilta mielellään juoksuisen nartun läsnä ollessa, sillä nartun läsnäolo parantaa sperman laatua ja keräyksen onnistumistodennäköisyyttä (Freshman 2002). Juoksuisen nartun läsnäolo auttaa myös hermostuneita ja ensi kertaa astuvia uroksia ejakuloimaan. Keräys voi onnistua myös ilman juoksuisen nartun läsnäoloa (Kutzler 2005).

5 SPERMAN LAADUN ARVIOINTI

Sperman laatua arvioidessa tulee huomioida sen käyttötarkoitus ja se, onko kyseessä hedelmällisyysongelman selvitys. Sperman laadun arviointi vaatii taitoa ja perehtyneisyyttä. Vaikka tutkittu uroskoiran sperma olisi hyvänlaatuista, ei se aina saa aikaan tiineyttä. Näissä tilanteissa tulee myös huomioida narttukoiran osuus tiinehtyvyydessä (Eilts 2005). Jos koiralta kerätään spermaa useammin kuin kahden päivän välein, vaikuttaa keräyskertojen tiheys siittiöiden määrään ejakulaatiota kohden. Keräystilanteen aiheuttama stressi saattaa vähentää sperman määrää, joten valkotakkiefekti tulee aina minimoida tilanteesta. Eläinlääkäriin tulee kerätä näyte normaaleissa vaatteissa ja jättää kaikki työvälineet, esimerkiksi stetoskooppi, pois tilanteesta (Freshman 2002).

Yleensä sperman laatua arvioidessa käytetään kriteereinä siittiöiden kokonaisliikkuvuutta, progressiivista liikkuvuutta, siittiötiheyttä, siittiöiden kokonaismäärää ja siittiöiden rakenteellisten vikojen tutkimusta. Spermasta voidaan tutkia myös alkaalisen fosfataasin (ALP) pitoisuus. ALP tuotetaan pääasiassa lisäkiveksissä ja siksi se on hyvä mittari siementiehyiden toiminnalle (Freshman 2002). ALP tutkitaan toisen fraktion seminaalipiasmasta. Jos spermassa ei ole siittiöitä (atsoospermia), tulisi aina tutkia seminaaliplasman ALP. Jos ALP on alhainen (<5000 U/L usein jopa <2000 U/L), voidaan epäillä epätäydellistä ejakulaatiota, tukosta siementiehyissä tai lisäkiveksen kehityshäiriötä (Stornelli ym. 2003).

5.1 Esitiedot

Uroksen terveellä rakenteella ja terveydellä on suuri merkitys lisääntymisessä (Fontbonne 2011). Ennen sperman keräystä koiralle tulee tehdä kattava yleistutkimus. Yleistutkimukseen kuuluu kivesten tunnustelu, peniksen tutkiminen ja eturauhasen tunnustelu peräsuolen kautta sekä mahdollisesti eturauhasen ja kivesten ultraäänitutkimus (Kolster 2018).

Aikaisempi lisääntymishistoria, ulkomaillakäynnit sekä sairaudet ja lääkitykset viimeisen kuuden kuukauden ajalta tulisi myös kirjata ylös. Koiran sukuhistorian ja sisäsiittoisuusasteen selvittäminen voivat olla myös avuksi (Freshman 2002).

5.2 Liikkuvuus (motiliteetti)

Sperman liikkuvuus tulee tarkistaa heti keräyksen jälkeen. Spermaa laitetaan tippa lämpimälle objektilasille ja se peitetään peitinlasilla. Jos näyte on liian tiheää, voidaan sekaan lisätä tippa fysiologista suolaliuosta. Siittiön normaali liike on nopeaa, tehokasta ja eteenpäin vievää. Vaikka siittiö liikkuu nopeasti ja tehokkaasti, mutta liike on kehää kiertävää, ei siittiön liikettä lasketa normaaliksi. Hyvälaatuisessa spermassa siittiöistä 70 %:n pitää olla normaalisti liikkuvia (Freshman 2002).

Liikkuvuus jaotellaan yleisesti neljään kategoriaan. Nopeasti suoraan etenevät, hitaasti etenevät (kaartelevat), paikallaan liikkuvat ja liikkumattomat siittiöt (Rijsselaere ym. 2007). Liikkumattomat siittiöt luokitellaan kuolleiksi. Kuolleet siittiöt nähdään eosin/nigrosin-värjäyksellä mikroskoopin alla vaaleanpunaiseksi värjäytyneinä, kun taas elävät siittiöt eivät värjäänny (Alonge ym. 2019). Astenotsoospermia on tila, jossa siittiöiden progressiivinen liikkuvuus on heikentynyt (World Health Organisation 2010). Hypo-osmoottisella turvottamisella (HOS-testi) voidaan määrittää kuolleet siittiöt elävien joukosta. HOS-testillä voidaan myös tutkia toimivatko kalvorakenteet normaalisti. Siittiö altistetaan hypo-osmoottiselle nesteelle, jossa elävä siittiö pystyy sääntelemään omaa nestetasapainoaan turvottamalla häntäänsä (Kolster 2018). Ihmisillä HOS-testin tuloksen on havaittu korreloivan hyvin siittiön kykyyn lävistää hamsterin zona-free munasolu. Ihmisillä zona-free munasolun hedelmöittäminen korreloi miehen siittiöiden kykyyn hedelmöittää munasolu in vitro (Martínez 2004). Ihmisillä spermalle tehdään HOS-testi, kun liikkumattomien siittiöiden määrä nousee yli 50 % (World Health Organisation 2010).

Liikkeen yhteydessä tulee myös arvioida siittiöiden agglutinaatio (Freshman 2002). Agglutinaatiolla tarkoitetaan tilannetta, jossa siittiöt kiinnittyvät toisiinsa. Siittiöitä, jotka kiinnittyvät kalvoon, roskaan tai kuolleeseen siittiöön ei lasketa agglutinoituneiksi.

Agglutinaatio antaa viitteitä immunologisesta ongelmasta (World Health Organisation 2010).

5.3 Tiheys

Sperman tiheys lasketaan siittiöpitoisesta fraktiosta. Tiheys määräytyy siittiöiden määrän ja fraktion tilavuuden suhteesta (Martinez 2004). Tiheys voidaan laskea joko Bürkerin kammiolla (Freshman 2002), densimetrillä tai laskurilla, joka laskee tiheyden automaattisesti fotometriä käyttäen (Kolster 2018).

Bürkerin kammiossa mitataan joko vain toisen fraktion tai ensimmäisen ja toisen fraktion yhteistä konsentraatiota. Näytettä sekoitetaan 1:100 raanaveteen tai Hancockin liuoksen kanssa. Saatu laimennos pipetoidaan Bürkerin kammioihin. Näytteen annetaan tasaantua kammioissa. Bürkerin kammion 3x3 ruudusta lasketaan siittiöiden määrä kummastakin kammioista ja määritetään keskiarvo. Keskiarvoon hyväksytään lukumäärät, jotka eroavat enintään 10 % toisistaan. Keskiarvo edustaa siittiöiden lukumäärää miljoonina spermamillilitraa kohti, $\times 10^6/\text{ml}$ (Freshman 2002).

5.4 Kokonaissiittiömäärä

Siittiöiden kokonaismäärä lasketaan kertomalla siittiötiheys ejakulaatin volyymilla (Freshman 2002). Normaalisti koira ejakuloi kerralla $300\text{--}2000 \times 10^6$ siittiötä (Senger 2003). Pienten rotujen ja erittäin isojen rotujen ejakulaatin määrä saattaa kuitenkin poiketa tästä. Isoilla roduilla ejakulaatin määrä on yleensä suurempi kuin pienillä roduilla. Jos siittiöiden määrä on vähentynyt, tulee ottaa uusi näyte seitsämän vuorokauden kuluttua (Freshman 2002). Kivesten koolla on merkittävä yhteys siittiöiden määrään ejakulaatiota kohden. Mitä isommat kivekset koiralla on, sitä runsaampaa on siittiöiden tuotanto (Kolster 2018). Isommissa kiveksissä on enemmän siementiheyttä, jolloin siittiöitä pystytään tuottamaan enemmän (Senger 2003).

Joskus spermassa ei ole havaittavissa siittiöitä. Tätä tilaa kutsutaan atsoospermiaksi. Atsoospermia on yhdistetty koirilla immunivälitteisiin tauteihin, sisäsiittoisuuteen,

kasvaimiin sekä geneettisiin, rakenteellisiin ja hormonaalisiin ongelmiin (Fontbonne 2011, Tesi ym. 2018).

Siemennettäessä koiraa tuoreella spermalla vaginaan, tulee siittiöiden määrän olla vähintään 200×10^6 liikkuvaa siittiötä. Siemennettäessä pakastetulla spermalla kohtuun tulee siittiöiden määrän olla vähintään $150\text{--}200 \times 10^6$ liikkuvaa siittiötä (Martínez 2004).

5.5 Rakenteelliset viat (morfologia)

Morfologiaa tutkitaan faasikontrastimikroskoopilla. Näyte levitetään objektilasille samoin kuten esimerkiksi verisively. Värjäys tehdään yleisimmin eosin/nigrosin-värjäyksellä tai Diff-Quik- värjäyksellä (Freshman 2002). Myös Farelly- ja Spermac-värjykset ovat käytössä (Boersma ym. 2001). Spermac on erityisesti pakastetulle spermalle kehitetty värjäysmenetelmä morfologian tarkasteluun (Kolster 2018). Eosin/Nigrosin värjäys on yleisimmin käytössä kotieläimillä, koska se on nopea ja helppo värjäys. Sen avulla määritetään epänormaalien ja normaalien sekä kuolleiden ja elävien siittiöiden määrää. Eosin/nigrosin-värjäyksen heikkona puolena on se, että liuos saattaa olla hypotoninen ja siten vaikuttaa siittiöiden morfologiaan (Martínez 2004).

Mikä tahansa poikkeama siittiön normaalista rakenteesta määritellään rakenteelliseksi viaksi (Senger 2003). Rakenteelliset viat jaotellaan lieviin ja vakaviin. Spermatutkimuksissa siittiön rakenteen mikroskooppinen tarkastelu tulee aina tehdä vähintään sadalle siittiölle/näyte (Leonardo 2007). Viat voidaan myös jaotella primaarisiin ja sekundaarisiin vikoihin. Primaareina vikoina pidetään niitä, jotka kehittyvät spermatogeneesin aikana ja sekundaariset viat ovat niitä, jotka kehittyvät kiveksistä poistumisen jälkeen, eli liittyvät usein lisäkiveksen epätäydelliseen toimintaan (Kolster 2018). Jaottelut rakentuvat ajatukselle, että vikojen syy ja vaikutus hedelmällisyyteen tunnetaan. Jos rakenteellisen vian syytä tai seurausta ei tunneta, ei sitä voida jaotella mihinkään luokkaan (Leonardo 2007). Jokaisessa ejakulaatiossa on 5–15 % epänormaaleita siittiöitä (Senger 2003). Jos rakenteellisia vikoja on enemmän kuin tämän verran, tilaa kutsutaan teratotsospermiaksi (World Health Organization 2010). Osa rakenteellisista vioista vaikuttaa hedelmällisyyteen enemmän ja osa vähemmän. Epämuodostumat jaotellaan pään-, keskikappaleen- tai hännän rakenteellisiin vikoihin

(Senger 2003). Pääalueen rakenteellisten vikojen merkittävimmät muutokset liittyvät akrosomiin tai kromatidin häiriöihin (Chemes 2018). Ihmisillä siittiöiden morfologia vaikuttaa olevan paras miehen hedelmällisyyttä ennustava tekijä (Kruger ym. 1988).

Taulukoissa 1, 2 ja 3 on lueteltu yleisimpiä siittiön rakenteellisia vikoja. Siittiön rakenteellisiin vikoihin vaikuttavat monet erilaiset häiriöt siittiöiden kehityksen aikana. Häiriöt siittiönkehityksessä tuottavat useita erilaisia rakenteellisia vikoja. Onkin harvinaista, että uroksen näytteestä löydetään vain yhdellä tavalla rakennevikaisia siittiöitä. (Martínez 2004).

Lämpöstressi voi aiheuttaa siittiöön rakenteellisia vikoja. Lämpöstressi voi muodostua esimerkiksi yleistyneestä tulehdustilasta, hypertermiasta tai paikallisesta tulehduksesta lisääntymisteissä. Muita syitä siittiöiden rakenteellisille vioille ovat muun muassa testosteronin tuotannon väheneminen, iatrogeeniset syyt sekä ympäristön aiheuttama lisästressi. Iatrogeenisia syitä ovat esimerkiksi lääkinnästä aiheutuvat normaalien elimistön säätelymekanismien häiriöt, kuten häiriöt spermatogeneesissä. Siittiölle haitallisia lääkeaineita ovat muun muassa kortisoni ja hormonaaliset lääkkeet. Lisästressi voi syntyä esimerkiksi omistajanvaihdoksen yhteydessä (Martínez 2004). Ihmisillä on havaittu olevan yhteys sperman rakennevikojen ja valkosolujen kromosomiepämuodostumien kanssa (Lewis-Jones ym. 2003).

Taulukko 1 pääosan rakenteelliset viat

Rakenteellinen vika	Kuvaus	Vaikutus hedelmällisyyteen
akrosomin epämuotoisuus (2)	Pään kraniaalipinnalla akrosomi on pieni tai puuttuva (2).	Jos akrosomi puuttuu, ei tapahdu penetraatiota- Jos akrosomi löytyy, teoreettinen mahdollisuus tiineyteen (2).
Knobbed akrosomi (1)	Pääosan pinnan muutokset mm. akrosomikalvon taitokset (1).	Pienentynyt mahdollisuus tiineyttämiseen, koska akrosomissa vikaa (3).
Suippeneva pää (1)	Pää suippenee, joko distaaliosasta tai koko matkalta (1). Yhdistetty kromosomimuutoksiin (2).	Ei tietoa (1). Ihmisillä yhdistetty abortteihin ja hedelmättömyyteen (2).
Suuri/pieni pää (1)	Pään koko joko liian iso tai liian pieni (1). Yhdistetty kromosomimuutoksiin. Suuripäisyys on yhdistetty myös akrosomin epämuotoisuuteen (2).	Ei tietoa (1). Ihmisillä yhdistetty abortteihin ja hedelmättömyyteen (2).
Irtonainen pää (2)	Pääosasta puuttuu häntä ja keskiosa (2).	Huonontaa merkittävästi tiinehtyvyyttä. Jos ainoana siittiömuotona, on potilas steriili (2)
Nuclear vacuoles (1) /creator/dideemi defekti (5)	Pääalueen pinta näyttää kuoppaiselta (1). Sekoittaa helposti knobbed akrosomiin (3).	Epäillään olevan vaikutus tiinehtyvyyteen (1).

Numerot taulukoissa vastaavat seuraavia viitteitä (1) Tesi ym. 2018, (2) Chemes 2000, (3) Leonardo 2007

Taulukko 2 keskiosan rakenteelliset viat

Rakenteellinen vika	Kuvaus	Vaikutus hedelmällisyyteen
Proksimaalipisara (2)	Voi esiintyä hännän keskiosassa. Liitetään esipuberteettiin, lisäkiveksen toimimattomuuteen sekä ikääntymiseen (3).	Heikentää tiinehtyvyyttä, esipuberteetin jälkeen voi hävitä ja tiinehtyvyys voi olla normaalia (3).
Pään puuttuminen ”dekapitaatio” (2)	Siittiön häntiä ilman päätä. siittiön päässä saattaa olla proksimaalipisara (2)	Huonontaa merkittävästi tiinehtyvyyttä. Ainoana siittiömuotona aiheuttaa steriiliyttä (2).
Kaksi häntä-/keskiosaa/päätä (1,3)	Tuplasti jotakin näistä. Usein johtuen virheellisestä spermatogeneesistä (3).	Vähän tutkittu. Keskiosan kahdentumalla ei uskota olevan suurta merkitystä tiinehtyvyyteen, pään ja hännän kahdentumalla on (3).

Numerot taulukoissa vastaavat seuraavia viitteitä (1) Tesi ym. 2018, (2) Chemes 2000, (3) Leonardo 2007

Taulukko 3 häntäosan rakenteelliset viat

Rakenteellinen vika	Kuvaus	Vaikutus hedelmällisyyteen
Hännän kiertymä (1)	Häntäkiertynyt itsensä ympärille (1).	Ei tietoa (1)
Hännän taittuminen (1)	Häntää on kiertynyt niin että se muodostaa kirjaimen J. Distaalipisara on usein taitoksessa ’jumissa’ (3).	Alhainen hedelmällisyys tai steriili (3).

Numerot taulukoissa vastaavat seuraavia viitteitä (1) Tesi ym. 2018, (2) Chemes 2000, (3) Leonardo 2007

5.6 Sytologia

Ejakulaatin poikkeava väri voi kertoa sperman seassa olevista vierasaineista. Keltainen väri antaa viitteitä virtsasta tai märkäeritteestä. Vihreä väri on myös yhdistetty mätään. Punainen väri kertoo siitä, että spermassa on verta (Freshman 2002). Sperman verisyys johtuu useimmiten eturauhasen hyvälaatuisesta liikakasvusta. Myös trauma tai kiveskasvain voivat aiheuttaa veren esiintymistä spermassa. Yleisesti ajatellaan, että spermassa ei-toivotut aineet, kuten veri ja virtsa, vaikuttavat siemenen laatuun. Veri spermassa ei välttämättä aiheuta hedelmättömyyttä (Rijsselaere ym. 2004). Veri häiritsee pakastusta, sillä punasolut vapauttavat hajotessaan entsyymejä, jotka ovat haitallisia siittiöille (Rijsselaere ym. 2004).

Sperman normaali sytologia sisältää siittiöitä, valkosoluja (2-4/ high-power-field (hpf), eli 100x objektiivilla keskiverto määrä näkökentässä), epiteelisoluja, bakteereja ja punasoluja. Jos kuitenkin valko- ja punasolujen määrä on suuri ja näytteessä havaitaan solunsisäisiä bakteereja, voidaan epäillä tulehdusta lisääntymisteissä (Freshman 2002). Sperman bakteeriviljely on suositeltavaa epäselvissä tapauksissa. Domosławskan ym. (2018) kirjoittamassa tapausselostuksessa kuvaillaan tapaus 6-vuotiaasta Jackrusselinterrieristä. Koiran sperman siittiöiden liikkuvuudessa ja määrässä ei ollut merkittäviä muutoksia, mutta viimeisimmät sen astumat nartut eivät olleet tiinehtyneet. Aikaisemmin uros oli onnistuneesti tiineyttänyt useamman nartun. Sperman kolmannesta fraktiosta oli saatu bakteeriviljelemällä eristettyä *Stenotrophomonas maltophilia*. Koira oli hoidettu antibiooteilla ja se oli hoidon jälkeen onnistuneesti tiineyttänyt kaksi narttua.

5.7 pH

Sperman pH mitataan ensimmäisestä ja toisesta fraktiosta yhdistetystä näytteestä. Näytteen pH vaihtelee 5,5 ja 8 välillä ollen yleensä 6,3-7,0. Seminaaliplasman normaali pH on 6,3-7,0 ja eturauhasesta peräisin olevan nesteen pH on 6,0-7,4 (Freshman 2002).

Ihmisillä atsoospermiassa pH:n ollessa alle 7 (normaali 6,4-8,0) epäillään siementiehyiden tukosta tai molemminpuolista synnynnäistä siittionjohtimen puutosta (World Health Organisation 2010).

5.8 Laadun arviointiin vaikuttavat tekijät

Koiran ei pitäisi antaa astua narttua tai koiralta ei pitäisi kerätä spermaa juuri ennen sperman tutkimista, sillä se voi heikentää arvosteltavia arvoja (Alonge ym. 2019). Harvoin ejakuloivalla uroksella voi sperman laatu olla heikompi ensimmäisellä tutkimuskerralla ja esimerkiksi siittiöiden liikkuvuus voi olla heikentynyt (Martínez 2004). Penistä tulee ravistella ennen näytteenottoa, jotta ylimääräinen virtsa poistuu virtsateistä (Freshman 2002).

Kun urokselta kerätään spermaa, todennäköisyys hyvään ejakulaatioon kasvaa, jos mukana on hyvässä kiimassa oleva narttu (Kutzler 2005). Narttu ei saa olla aggressiivinen, jotta uroksen libido ei laske (Freshman 2002). Joillekin uroksille on erektion onnistumisen kannalta tärkeää, että paikalla on kiimassa oleva narttu, kun taas toisille voi riittää esimerkiksi pala kangasta, jossa on juoksuvuotoa. Huono erektio saa aikaan epätäydellisen ejakulaation (Kutzler 2005).

Koiralla voi esiintyä myös synnynnäisesti huonoa libidoa. Endokrinologiset sairaudet voivat vähentää testosteronin määrää veressä ja siten heikentää astumiskäyttäytymistä (Nelson & Couto 2014).

Joskus uroksilla esiintyy siemennäytteenotossa siittiöttömiä (atsoospermia) näytteitä. Syynä voi olla epätäydellinen tai keskeytynyt ejakulaatio, tukos siemenjohtimissa tai jokin hedelmättömyyttä aiheuttava sairaus. (Nelson & Couto 2014).

Perinteiseen mikroskoopin avulla tehtävään sperman laadun tutkimiseen liittyy keskeisenä ongelmana subjektiivisuus sekä se, ettei tutkimusta pystytä suorittamaan aina samalla standardilla. Erityisesti liikkuvuutta arvioidessa lämpötila ja arvioijan ammattitaito ovat kriittisiä tekijöitä (Rijsselaere ym. 2007). Arvioinnissa tulisi käyttää faasikontrastimikroskooppia (Kolster 2018).

6 MUITA TUTKIMUSMENETELMIÄ

6.1 Fluoresoiva värjäys

Fluoresoivan värjäyksen avulla pystytään tutkimaan muun muassa siittiön solukalvon kuntoa, kapasitaatiota sekä akrosomireaktioita (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005). Spermaa levitetään objektilasille, kiinnitetään etanolilla ja uutetaan fluoresoivalla värillä. Värjäyksen annetaan vaikuttaa 30 minuutin ajan +4 asteessa. Väri huuhdellaan pois tislattulla vedellä. Värjäys suoritetaan pimeässä huoneessa. Näytteen annetaan kuivua vuorokauden ajan pimeässä +4 asteen lämpötilassa (Varesi ym. 2012). Värjäyksen jälkeen objektilaseja tarkastellaan fluorenssimikroskoopilla. Tuloksia tulkitaan niin, että jos siittiöön on tarttunut fluoresoivaa väriä, on siittiö elossa. Jos taas fluoresoiva väri ei ole tarttunut, siittiö luokitellaan kuolleeksi (Bencharifa ym. 2010).

6.1.1 NucleoCounter

Fluoresoivaa värjäysmenetelmää on myös sovellettu laitteistoksi, joka hoitaa automaattisesti siittiöiden värjäämisen sekä laskemisen. NucleoCounter SP-100 käyttää fluorenssivärjäykseen propidiumjodidia (PI), joka värjää siittiön deoksiribonukleiinihapon (DNA). PI ei pääse sitoutumaan DNA:han, jos siittiön kalvorakenne on ehjä, joten elävät siittiöt eivät värjäänny. NucleoCounter määrittää sperman konsentraation ja kalvorakenteen eheyden. Laitetta on käytetty koiran, sonnin, orin, karjun ja ihmisen sperman tutkimiseen (Daub ym. 2016).

6.2 CASA

Ihmisten sperman laadun arvioinnissa käytetään yleisesti tietokoneavusteista analyysia, computer assisted sperm analysis (CASA), jolla voi tutkia myös koirien spermaa (Rijsselaere ym. 2007). CASAn toiminta yhdistää automaattisen tietokoneen ja mikroskoopin varusteet. CASA toimii fotometrinä. Se ottaa useita kuvia, joista se identifioi siittiöt (Kolster 2018). CASA antaa nopeasti tarkan tuloksen eri parametreistä, kuten liikkuvuudesta ja jaottelee liikkuvuuden nopeasti eteneviin, hitaasti eteneviin,

paikallaan liikkuviin ja liikkumattomiin siittiöihin. Se myös antaa arvion sperman lineaarisesta liikkeestä (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005). CASA-laitteella pystytään arvioimaan tuhansia siittiöitä alle minuutissa (Rijsselaere ym. 2007).

Eri lähteissä (Kolster 2018, Martínez 2004) kannustetaan CASAn käyttöön, sillä se antaa objektiivisemmän kuvan siittiöistä ja sperman laadusta, kuin silmämääräinen arvio. Vaikka spermaa tutkisi joka kerta asiansa osaava henkilö, saattavat näkemykset olla erilaisia ja siten aiheuttaa eriäviä tuloksia (Kolster 2018). Koska mittauksen tekee aina koneisto, huomaa se pienemmätkin muutokset mittauskertojen välillä (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005).

CASA-laitteisto on alkuinvestoinniltaan kallis (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005) Ihmisillä CASA on yleisesti käytössä (World Health Organisation 2010). Suomessa Yliopistollisessa tuotantoeläinsairaalassa on käytössä Hamilton-Thorne, joka on yksi CASA laitteista (Henkilökohtainen tiedonanto professori Juhani Taponen 27.3.2019).

6.3 Sperm Quality Analyzer (SQA)

SQA-laitteella voidaan tutkia tuoretta tai pakastettua spermaa. Laitteen toiminta perustuu sen kykyyn havaita vaihtelut sperman optisessa tiheydessä. Laite antaa tuloksen sperman laadusta sperman liikkuvuuden indeksinä (SMI), joka määrittellään konsentraation, normaalin morfologian (%) ja liikkuvuuden avulla. SMI on laitteiston suunnittelijan mukaan kokonaismääräinen kuva sperman laadusta (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005).

SQA on edullinen yleiskone, jonka tulos korreloi hyvin CASA-laitteiston hyvän ja erinomaisen laadun omaavan sperman tulosten kanssa. Huonolaatuisen sperman kanssa korrelaatio ei ollut niin suora. SMI:n ja koiran hedelmällisyyden välistä korrelaatiota ei ole tutkittu (katsauksessa Rijsselaere ym. 2005).

6.4 Sukupuolilajiteltu sperma

Sukupuolilajittelu tehdään yleisesti virtausytometrillä. Tämä tekniikka jaottelee X- ja Y-kromosomin niiden sisältämän DNA:n määrän mukaan. Laite on optimoitu naudoille ja

naudoilla onkin saatu 50 % tiinehtyvyys 90 % sukupuolitarkkuudella (Garner & Seidel 2003).

Koirilla siittiöiden X- ja Y-kromosomin DNA:n välinen ero on 3,9 % (Garner & Seidel 2003). 95 %:n sukupuolijaottelun tarkkuus saavutetaan, kun ero sukupuolikromosomeissa on suurempi kuin 3,5 % (Johnson 2000). Tämä mahdollistaa sukupuolijaottelun koiran spermasta. Siemennyksiä sukupuolilajitellulla spermalla ei kuitenkaan ole tehty koiralle, vaikka kiinnostusta tähän olisi niin lemmikkipuolen kuin työkoirapuolen kasvattajilla (Garner & Seidel 2003)

Sukupuolilajittelussa on kuitenkin omat huonot puolensa. Se vaurioittaa usein siittiöiden kromosomistoa ja erotteluun tarvittavan laitteiston hinta on erittäin korkea. Voi siis käydä niin, että kasvattaja maksaa suuren summan sukupuolilajittelusta spermasta, mutta pentuja ei synny yhtään tai syntyy vain yksi (Garner & Seidel 2003).

7 MUITA HEDELMÄLLISYYTEEN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

7.1 Uroksesta johtuvat viat

Uroksen terveellä rakenteella ja terveydellä on suuri merkitys lisääntymisessä (Fontbonne 2011). Ennen sperman keräystä koiralle tuleekin tehdä kattava yleistutkimus. Yleistutkimukseen kuuluu myös kivesten tunnustelu, peniksen tutkiminen ja eturauhasen tunnustelu peräsuolen kautta (Kolster 2018). Uros, jolla on ongelma tuki- ja liikuntaelimistössä ei välttämättä pysty kivuiltaan astumaan narttua. Liian suuri uros voi painaa niin paljon, ettei narttu kykene kannattelemaan sen painoa. Liian pieni uros taas ei yletä astumaan suurempaa narttua. Uroksella saattaa olla liian pieni tai suuri penis. Liian pieni penis ei jää kiinni astumisen yhteydessä nartun vaginaan, jolloin siemenestettä ei saada riittävää määrää kohtuun (Fontbonne 2011).

Eturauhasen tulehdus ja kystat ovat merkittävimpiä hoidettavissa oleva terveydellisiä tiloja, joiden on koirilla havaittu aiheuttavan hedelmättömyyttä (Fontbonne 2011). Eturauhasen häiriöt jaotellaan eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvuun, eturauhasen

bakteriellin tulehdukseen, eturauhasen kystaan ja eturauhasen kasvaimiin. Koska seminaaliplasma on enimmäkseen eturauhasessa tuotettua nestettä, eturauhasen häiriöt vaikuttavat oleellisesti spermaan. Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu ei kuitenkaan yleensä johda täydelliseen steriiliyteen (Memon 2007).

Uroskoirilla tavataan atsoospermiaa tapauksissa, jossa koiran molemmat kivekset ovat piilokiveksiä. Yksipuolinen piilokives harvoin aiheuttaa hedelmällisyshäiriöitä (Fontbonne 2011). Spermatogeneesi tarvitsee elimistöä viileämmät oltavat ja siksi kiveksen tulee olla kivespussissa. Jos kives on muualla kuin kivespussissa, spermatogeneesia ei tapahdu ja kives atrofioiduu (Toppari & Huhtaniemi 1999). Piilokiveskoirilla ei kuitenkaan ole havaittu poikkeavia arvoja testosteronin tuotannossa. Piilokiveskoiraa ei tulisi käyttää jalostuksessa, sillä piilokiveksisyys on periytyvä ominaisuus. Se on myös yhteydessä muihin perinnöllisiin vikoihin, muun muassa nivustyrään, polvilumpion sijoiltaan menoon sekä eturauhasen ja peniksen ongelmiin (Memon 2007).

Kiveskasaimet saattavat aiheuttaa hedelmällisyyden laskua jo silloin, kun ne eivät ole vielä palpoiden tunnettavissa. Erityisesti sertolisolu- ja leydiginsolukasvaimet aiheuttavat hormonaalisia muutoksia ja siten vaikuttavat testosteronin määrään. Kasvaimet voivat myös aiheuttaa rakennevikoja siittiöissä (Fontbonne 2011).

7.2 *Brucella canis*

Brucella canis on maailmalla yleisesti hedelmättömyyttä aiheuttava bakteeri (Keid ym. 2015). Suomessa *B. canis* on tavattu vain harvoin ja raportoidut tapaukset liittyivät tuontikoiriin (Ruokavirasto) *B. canis* on garm-negatiivinen solunsisäinen kokkibakteeri, jonka reservuaarina on koira. *B. canis* voi olla koiralla oireeton, mutta sen on myös todettu aiheuttavan alkuiden resorboitumista, aborttia, lisäkiveksen, kiveksen ja eturauhasen tulehdusta (Krecic 2019). Kivestulehdus voi edetä siihen, että kives pienenee sekundaarisen fibroosin johdosta (Makloski 2011).

Siittiöiden muutokset tapahtuvat suhteellisen nopeasti infektion alkamisesta. Kahden viiden viikon sisällä 30-80 % siittiöistä on epänormaaleja. 10-15 viikon päästä havaitaan

enää muutama normaalirakenteinen ja eteenpäin liikkuva siittiö. Siittiöiden välistä agglutinaatiota havaitaan runsaasti (Fontbonne 2011).

B. Canis leviää eritteiden välityksellä, muun muassa syljen, sperman, maidon ja kyynelneesten välityksellä. Eniten sitä kuitenkin erittyy spermasta, kohtueritteestä ja emättimen limakalvolta. Tartunta voi levitä myös ilman tai toisen organismin välityksellä. Uroksilla keinosiementäminen vähentää tartunnan riskiä. Narttu voi saada tartunnan infektoituneesta spermasta (Makloski 2011). Koira on loppuelämänsä taudin kantaja. Suurissa kenneleissä tautia kantavat jalostusyksilöt tulisivat lopettaa tai vähintään poistaa laumasta ja kastroida tai steriloida leviämisen estämiseksi (Nelson & Couto 2014)

7.3 Muita patogeeneja

Ihmisillä useat kuumetaudit aiheuttavat miehen steriiliyttä. Yleistynyt tulehdus vaurioittaa kiveskudosta. Ihmisten ja eläinten normaalibakteeristosta löytyy useita mikrobeja, jotka tilaisuuden tullen voivat aiheuttaa systeemisairausten ja hedelmällisyshäiriöitä. Nartuilta löytyy samankaltainen bakteeristo sukupuolielimistöstään kuin urokselta (Fontbonne 2011). Näistä merkittävimmät mikrobit ovat listattu taulukossa 4 (Graham & Taylor 2012, Arantes ym. 2009, Dahlbom ym. 2009).

Taulukko 4 muita merkittäviä patogeenejä

Mikrobi	Rakenne	Hedelmällisyyteen liittyvät ongelmat	Tartunta
<i>Mycoplasma</i> <i>spp./ureaplasma</i> <i>spp.</i> (1)	Mikro- organismi (1)	Abortteja. Uroskoiralle eturauhasen- ja lisäkiveksen tulehdusta (1)	Kuuluu koiran normaaliflooraan (1)
<i>Leptospira</i> spp. (1)	Spirokeeta bakteeri (1)	Abortteja, kuolleena syntyneet pennut. Uroksen sukupuolielimiin systeemisen tulehduksen seurauksena (1)	Ei kuulu normaaliflooraan. Tarttuu eritteiden mukana limakalvolta (1)
<i>Escherichia coli</i> (1)	Gramnegatiivin en sauvabakteeri (1)	Aiheuttaa harvoin abortteja (1). Aiheuttaa usein bakteriellin eturauhasen tulehduksen	Kuuluu koiran normaaliflooraan (1)
<i>Campylobacter</i> <i>spp.</i> (1)	Gramnegatiivin en sauvabakteeri (1)	Abortteja ja narttun sukupuolielimen tulehduksia (1)	Ei kuulu koiran normaaliflooraan. Tartunta usein ympäristöstä. Zoonoosi (1)
<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> (2)	Parasiitti (2)	Abortteja, kuolleena syntyneet pennut (2)	Ei kuulu normaaliflooraan. Zoonoosi, joka voi levitä sperman välityksellä (2)
<i>Canine</i> <i>herpesvirus-1</i> (3)	herpesvirus (3)	Abortteja, kuolleena syntyneet pennut (3)	Ei kuulu normaaliflooraan. Rokote kehitetty tiineille eläimille (3)

Numerot taulukoissa vastaavat seuraavia viitteitä (1) Graham & Taylor 2012, (2) Arantes ym. 2009, (3) Dahlbom ym. 2009

7.4 Ravintolisät

Euroopan lemmikkieläinkasvatusteollisuusjärjestö (European Pet Food Industry Federation) on antanut suosituksensa eläinten ruuassa oleville vitamiineille ja hivenaineille. Suositellut annokset olivat: E-vitamiinia 3 mg/elopainokiloa kohden, sinkkiä 2.4 mg/elopainokiloa kohden, seleeniä 0.003 mg/elopainokiloa kohden ja foolihappoa 0.02 mg/elopainokiloa kohden (Ahlstrøm ym. 2018)

Ravintolisien vaikutusta hedelmällisyyteen on tutkittu paljon ihmisillä ja jonkin verran eri eläinlajeilla. Ravintolisien tulisi sisältää hivenaineita ja antioksidantteja. E-vitamiinin, seleenin, sinkin ja foolihapon on todettu parantavan sperman laatua. Myös omega-3-rasvahapoilla on merkitystä siittiön laatuun. Vesiliukoiset hivenaineet eivät varastoidu elimistöön, joten niitä tulisi saada päivittäin ravinnosta (Alonge ym. 2019).

7.4.1 Rasvahappo- ja vitamiinilisä

Rasvahapon määrä ruokavaliossa vaikuttaa lisääntymiselinten kudosten rasvahappopitoisuuteen. Koirilla rasvahapot, erityisesti omega-3-rasvahapot, saadaan useimmiten kalaöljyistä (Risso ym. 2016).

Erityisesti kalasta saatavat monityydyttyneet öljyt vaikuttavat siittiön kalvon omega-3 ja omega-6 rasvahappojen suhteeseen, lisäten siittiöiden liikkuvuutta (Alonge ym. 2019). Kalaöljyillä voidaan parantaa siittiöiden kokonaismäärää ja liikkuvuutta sekä vähentää rakenteellisia vikoja. Kalaöljyn lisääminen ravintoon voi vähentää siittiöiden kuolleisuutta. Koska rasvahapoilla ei ole antioksidanttista vaikutusta, suositellaan yhteiskäyttöä E-vitamiinin kanssa (Risso ym. 2016).

Risso ym. (2016) tutkivat myös kalaöljyn vaikutusta seerumin testosteronipitoisuuteen. Testosteronin määrä seerumissa laski siinä testiryhmässä, joka sai rasvahappo- ja vitamiinilisää. Muutos testosteronipitoisuudessa huomattiin jo ensimmäisessä kontrollissa (30 vrk). Seuranta tehtiin yhteensä 120 vuorokautta ja näytteitä otettiin 30 vuorokauden välein. Koejakson aikana testiryhmän testosteronitasot pysyivät koko ajan alhaalla ja kontrolliryhmän testosteronitasot pystyivät lähtöarvoissa.

7.4.2 Vitamiinit ja hivenaineet

E-vitamiini on elimistön merkittävin antioksidantti. Se suojaa kiveksiä oksidatiiviselta stressiltä (hapetus-pelkistystilan epätasapaino) ja näin parantaa siittiöiden laatua (Alonge ym. 2019). E-vitamiini suojaa siittiöitä rasvojen härskiintymiseltä (lipidiperoksidaatiolta). Sen vaikutusta sperman laatuun on tutkittu ihmisillä, karjuilla, sonneilla ja päseillä. E-vitamiinilisällä on sperman laatua parantava ominaisuus. E-vitamiini lisää muun muassa sperman liikkuvuutta, konsentraatiota sekä vähentää siittiöiden rakennevikoja (Domosławska ym. 2018).

Seleeni on spermatogeneesissä välttämätön hivenaine. Sitä tarvitaan erityisesti siittiön kypsymisen aikana lisäkiveksessä (Domosławska ym. 2018) sekä sukuelinten kehityksen aikana (katsauksessa Ahsan ym. 2014). Seleenilisä lisää testosteronin eritystä kiveksistä (katsauksessa Ahsan ym. 2014). Seleenin puutoksen on todettu aiheuttavan siittiöiden laadun heikkenemistä ihmisillä, karjuilla, sonneilla ja vuohilla (Domosławska ym. 2018). Seleenin puutoksen aiheuttamia ongelmia ovat muun muassa kivesten epätäydellinen kehittyminen ja lisääntyneet siittiöiden rakenteelliset viat (katsauksessa Ahsan ym. 2014).

Domosławska ym. (2018) tutkivat seleenin ja E-vitamiinin yhteisvaikutusta siittiöiden laatuun. Seleeni ja E-vitamiini ovat synergistisiä, eli ne tukevat toistensa vaikutustehoa. Domosławska ym. (2018) tutkimuksen mukaan seleeni ja E-vitamiini lisäävät siittiöiden konsentraatiota sekä normaalien ja liikkuvien siittiöiden määrää. Paikallaan liikkuvien ja kokonaan liikkumattomien siittiöiden määrä taas laski merkittävästi.

Sinkillä on useita tärkeitä tehtäviä lisääntymiseen liittyen. Se on mukana hedelmöitymisessä ja munasolun kiinnittymisessä kohtuun. Sinkkiä löytyy runsaasti spermasta ja se on raudan jälkeen toiseksi merkittävin alkuaine kudoksissa. Spermassa olevan sinkin määrän on osoitettu olevan suoraan verrannollinen siittiöiden liikkuvuuteen (Alonge ym. 2019).

E-vitamiini, seleeni ja sinkki ovat merkittäviä tekijöitä siittiöiden oksidatiivisen stressin siedossa (Alonge ym. 2019; Domosławska ym. 2018). E-vitamiini- ja seleenilisää tulisi käyttää aina yhdessä, sillä niiden toiminta on toisiaan tukevaa (Domosławska ym. 2018).

Sinkki on osana superoksidimutaasissa ja seleeni on osana glutathioniperoksidaasissa (Alonge ym. 2019).

Foolihapon eli B9-vitamiinin merkitystä on tutkittu erityisesti raskaana olevilla naisilla, koska se on merkittävä tekijä sikiönkehityksessä. Nykytiedon mukaan foolihapolla on merkitystä myös nartun tiineydessä (Alonge ym. 2019). Domosławskan ym. (2013) tutkimuksessa kitalaki- ja huulihalkioiden määrä laski noin 4 % lyhytkuonoisilla roduilla, kun emot saivat 5 mg foolihappoa päivittäin koko tiineyden ajan. Ihmiselle tehdyissä tutkimuksissa on myös havaittu, että foolihappo vaikuttaa siittiöiden konsentraatioon ja kokonaismäärään positiivisesti (Wallock ym. 1997).

7.5 Hormonit

Koiran hedelmällisyystutkimuksen osana voidaan määrittää veren hormonipitoisuuksia. Testosteronin alhainen määrä voi viitata hedelmällisyyden laskuun, kun taas kohonnen follikkeleita stimuloivan hormonin (FSH) määrä voi viitata primaariseen kivesvikaan (Kolster 2018). Testosteronin kohonnut määrä voi olla merkki Leydiginsolukasvaimesta tai muusta ongelmasta (Fontbonne 2011). Fontbonnen (2011) artikkelissa klinikalla oli käynyt useita hedelmättömiä uroksia, joiden veren testosteronipitoisuus oli koholla. Näillä potilailla ei kuitenkaan ollut viitteitä Leydiginsolukasvaimesta.

Ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa oli osoitettu ylipainon vähentävän testosteronin, FSH:n ja LH:n (lutenisoiva hormooni) määriä sekä lisäävän leptiinin määriä veressä. Ylipainon oletetaan estävän estradiolin muuttamista testosteroniksi. Suuri määrä estradiolia (estrogeenin esiaste) aiheuttaa hypotalamuksessa estävän vaikutuksen, jolloin testosteronia tuotetaan vähemmän. Tutkimuksessa oletettiin myös kohonnen veren leptiinitason vähentävän kivesten tuottaman testosteronin määriä. Leptiinin määriä ei voitu täysin yhdistää hedelmättömyyteen (Amjad ym. 2019).

Steroidien käyttö aiheuttaa elimistön luonnollisen hormonituotannon laskua pitkällä käyttöväylillä. Kun lääkitys lopetetaan, elimistön hormonituotanto ei välttämättä palaudu normaaliksi, ja siksi spermatogeneesi voi vähentyä tai loppua kokonaan (Fontbonne 2011).

Ihmisillä on raportoitu tapaus, jossa miehellä esiintyi runsaasti kaksipäisiä siittiöitä. Miehellä todettiin erittyvän liikaa prolaktiinia. Kun tila saatiin korjattua lääkkeellisesti, kaksipäisiä siittiöitä ei enää nähty spermassa (Lewis-Jones ym. 2003).

7.6 Genetiikka

Sukupuoli määritellään sukupuolikromosomien, sukupuolielimien ja ulkoisten piirteiden mukaan. Kromosomaalinen sukupuoli määräytyy normaalisti hedelmöityksessä, kun joko X- tai Y- kromosomin sisältämä siittiö hedelmöittää munasolun. Aina tämä ei kuitenkaan onnistu täydellisesti. Mutaatioita ja virheitä voi tapahtua kaikissa vaiheissa kehitystä. Kromaattisiin epämuodostumiin luokitellaan kromosomiston määrälliset muutokset ja hedelmöittymisen yhteydessä tapahtuvat mutaatiot, joita ovat muun muassa kimeerit ja mosaiikit. Kimeerissä mutaatio on peräisin kahdesta hedelmöittyneestä munasolusta tai alkioista, jotka ovat yhdistyneet. Mosaiikki muistuttaa kimeeriä, mutta ero on siinä, että kimeerissä mutaatio tapahtuu kahden hedelmöittyneen munasolun kesken. Mosaiikissa mutaatio tapahtuu hedelmöittyneen munasolun kromosomistossa. Esimerkki mosaiikista on kromosomin trisomia, josta esimerkkinä on Downin syndrooma. Sukupuolielinten epämuodostumat taas liittyvät väärin kehittyneisiin sukupuolirauhasiin, esimerkiksi Müllerin tiehyiden kehityshäiriöön (Meyers-Wallen 1993).

Koirilla esiintyy Klinefelterin syndroomaa, jossa koiralla on kaksi X-kromosomia ja yksi Y-kromosomi (XXY). Ihmisillä syndrooma on yhdistetty vahvasti erilaisiin kasvainsairauksiin, kuten rintasyöpään ja kivessyöpään (Reimann-Berga ym. 2008). Mies voi olla aluksi hedelmällinen, mutta ajan myötä viimeistään tulee steriiliksi (Smyth & Bremner 1998). Koirilla XXY-kromosomisto yhdistetään vahvasti kiveskasvaimiin. Koira, jolla on XXY- kromosomisto, on syntymästään asti steriili (Reimann-Berga ym. 2008).

Ihmistutkimuksissa on löydetty Y-kromosomiin yhdistettyjä hedelmällisyshäiriöitä. Y-kromosomissa tapahtuu mikroleletaatioita, eli yksittäisiä geenejä poistuu luonnollisen geneettisen mutaation takia. Mikroleletaation vaikutuksesta spermatogeneesi häiriintyy. Yleisin oire löydettyissä tapauksissa on atsoospermia tai oligotsoospermia (siittiöiden määrä on vähentynyt) (Benedetto de Carvalho & Rodrigues Santos 2005).

Shang ym. (2018) tutkivat uroshiirien hedelmättömyyttä. Hiirikokeissa he määrittivät *PRSS55*-geenin, joka on yhdistetty miehillä hedelmättömyyteen. Merkittävin muutos oli, etteivät geeniä kantavat siittiöt kulkeutuneet hedelmöittämään munasolua elävässä eläimessä (in vivo). *PRSS55*-geeniin koodaaman proteiinin puutos ei vaikuttanut muihin sperman laadullisiin arvoihin tai parittelukäytökseen. Tutkimuksen perusteella voi siis päätellä, että geenin puuttuminen vaikuttaa sekä siittiön vaellukseen kohdussa että siittiön tunkeutumiseen munasoluun. Shang ym. (2018) mainitsee raportissaan *PRSS55*-geenin olevan hyvin säilynyt useilla eri lajeilla ja erityisesti nisäkkäillä.

Koirilla esiintyy erittäin harvinaisena tautina Kartagenen oireyhtymää, jossa elimistön kaikki värekarvat ovat liikkumattomia tai tehottomia. Kartagenen oireyhtymässä ensimmäisenä huomattava oire on yleensä hengitysteiden ongelmat. Syndroomaan kuuluvat myös liikkumattomat siittiöt ja siitä johtuva steriiliys (Fontbonne 2011).

Useat immuunivälitteiset hedelmättömyyden syyt ovat lääkkeillä hoidettavissa. Eniten tutkimuksia immuunivälitteisestä hedelmättömyydestä löytyy koirilla kilpirauhasen vajaatoimintaan liittyen. Ihmisillä aiheutta on tutkittu enemmän (Fijak ym. 2018). Kilpirauhasen vajaatoiminnan seurauksena laskeva hedelmällisyys vaikuttaa olevan enemmän narttujen ongelma (Johnson 2002). Uroksien hedelmättömyyden ja kilpirauhasen vajaatoiminnan välinen yhteys on vielä epäselvä (Fontbonne 2011). Uroksilla kilpirauhasen vajaatoiminta aiheuttaa heikentynyttä libidoa (Johnson 2002). Lisämunuaisen häiriöllä vaikuttaisi myös olevan yhteys uroksen lisääntymisongelmiin (Fontbonne 2011).

Uroskoirilla esiintyy myös immuunivälitteistä kivistulehdusta (Nelson & Couto 2014). Immuunivälitteisessä kivistulehduksessa merkittävänä aiheuttajana ovat kehon omat T-solut, jotka hyökkäävät kiveskudosta vastaan (Yule & Tung 1993).

Jalostusyksilöinä ei tulisi koskaan käyttää koiria, joilla tiedetään olevan immunologisia sairauksia. Immunologiset sairaudet ovat tutkitusti periytyviä (Goodnow 2007). Yleisesti ottaen geneettiset muutokset perimässä ja niistä johtuva hedelmällisyyden heikkeneminen tulisi huomioida jalostusvalintoja tehdessä (Freshman 2002).

8 LAIMENNUSNESTEET

Laimennusnesteen tehtävä on suojella soluja kylmältä, antaa ravintoa siittiöille (Barbas & Mascarenhas 2009) ja muokata siemennesteen konsentraatiota (Schäfer-Somi ym. 2006). Suojelevina mekanismeina toimivat oikea pH, puskurointiominaisuus ja sopiva osmolaliteetti (Barbas & Mascarenhas 2009).

Laimennusneste koostuu solukalvoa läpäisemättömästä, jäätymisen haitallisilta tekijöiltä suojaavasta aineesta (kryosuoja), solukalvon läpäisevästä kryosuojasta, puskurista, sokerilisästä, suolasta ja antibiootista. Solukalvoja läpäisemätön kryosuojaa-aine on usein kanamunan keltuainen. Läpäisevänä kryosuojana toimivat muun muassa glyseroli, etyleeniglyseroli (Barbas ja Mascarenhas 2009) ja DMSO (Oliveira ym. 2006). Happamuuden (pH) puskuriksi valitaan joko Tris tai Test. Tris ja Test ovat kahtaisioneja. Kahtaisioni toimii joko happona tai ionina, riippuen nesteen pH:sta. Tris on luonnollinen puskuri ja Test on syntetisoitu puskuri. Sokereita laimennusnesteessä voi olla yksi tai useampi. Näitä on muun muassa glukoosi, fruktoosi, laktoosi, raffinoosi sakkaroosi, trehaloosi (Barbas ja Mascarenhas 2009). Antibioottina käytetään yleensä penisilliiniä, steptomysiiniä ja dihydrostreptomysiiniä (Bencharifa ym. 2010).

Kanamunan keltuaiseen kemiallisena komponenttina, tarkkaan lasketussa yhdistelmässä, liittyy kuitenkin merkittävä ongelma. Keltuainen on eläinperäinen tuote ja siksi sille ei pystytä asettamaan standardeja. Useissa tutkimuksissa on etsitty korvaavaa ainetta keltuaiselle. Keltuainen on kokeissa korvattu esimerkiksi soijalektiinillä (Dalmazzo ym. 2018), alhaisen tiheyden lipoproteiinilla (LDL) ja Equex STM-pastalla. Equex STM-pasta on kananmunapohjainen valmis laimennusneste, joka on ominaisuuksiltaan koiran spermalle optimaalinen (Bencharifa ym. 2010).

Jäätymisen haitallisilta tekijöiltä suojaava aine on yleisimmin glyseroli. Vaikka glyseroli on myrkyllistä soluille suurina määrinä, se antaa hyvän suojan. Solun kuivumisen aikana se korvaa solunsisäisen nesteen itsellään, pienentää solun ulkopuolista jäätymispistettä sekä integroituu siittiön plasmamembraaniin muuttaen sen stabiilisuutta ja läpäisevyyttä (Van den Berghe ym. 2018).

Tris ja Tres toimivat pH:n puskureina. Suolan tehtävä on muokata nesteestä elimistön suolatasapainon omaava neste. Kun solu tulee suolan suhteen liian laimeaan nesteeseen se luovuttaa omia suola-ioneitaan nesteeseen ja tästä syystä lopulta tuhoutuu (Van den Berghe ym. 2018).

Sokerien tehtävänä on nostaa laimennusnesteen osmoottista painetta niin, että solun sisältä poistuu vettä. Tämä vähentää solunsisäistä jään muodostumista (Barbas & Mascarenhas 2009). Sokerit toimivat myös sperman ravinteina (katsauksessa Stănescu & Bîrțoiu 2012).

Sperma ei ole steriiliä, joten spermaan lisätään antibiootit suojaamaan kontaminaatiolta. Antibiootin käytön haittapuolia ovat antibiooteille vastustuskykyisten bakteerikantojen lisääntyminen sekä antibiootin mahdollinen siittiöitä tuhoava vaikutus (katsauksessa Stănescu & Bîrțoiu 2012).

9 JÄÄHDYTYS

9.1 Sperman jäähdytys siirtoa varten

Koiran spermaa jäähdyttäessä siihen tulee aina lisätä laimennusnestettä. Koiran sperma laimennetaan yleensä suhteessa 1:3, mutta suurempaakin laimennosta voi käyttää. Kuitenkin määrällisesti sperman ja laimennusaineen yhden annoksen seoksen tulisi pysyä 2-10 ml välillä. Nartun koko määrittää sperma-annoksen suuruuden (Linde-Forsberg 1995).

Jäähdytystä varten sperman ja laimennusnesteen seos laitetaan steriiliin putkeen, joka asetetaan vedellä (huoneen lämpöistä vettä) täytettyyn purkkiin. Tämä laitetaan kokonaisuutena jääkaappiin 30-60 minuutiksi. Tämän ajan sisällä seoksen lämpötilan tulisi laskea noin 4 asteeseen (Linde-Forsberg 1995).

Käyttöönottaessa spermaseos tulisi lämmittää huoneenlämpöiseksi hitaasti (Linde-Forsberg 1995).

Jäähdytetty spermaseos on helpompi kuljettaa kuin pakastettu sperma. Kylmäsäilytyksen aikana kuolee vähemmän siittiöitä ja sen tiineyttämistodennäköisyys on parempi kuin pakastetulla. Hyvälaatuisella jäähdytetyllä spermalla voi siementää vaginaan tai kohtuun. Jäähdytetyn sperman käytön haasteena on keräämisen, kuljetuksen ja siemennyksen ajoittaminen (Linde-Forsberg 1995).

9.2 Sperman pakastus säilytystä varten

Koiran sperman pakastamiselle on useita käytäntöjä. Käytäntöjen erot liittyvät usein jäähdytys- ja pakastuslämpötiloihin, jäähdytys- ja pakastusaikoihin ja laimennusnesteen komponentteihin (Oliveira ym. 2006).

Koiran spermalle usein kuvailtu pakastustekniikka tapahtuu yleensä kaksivaiheisesti (Bencharifa ym. 2010; Caturla-Sánchez 2018; Seager ym. 1975; Schäfer-Somi ym. 2006). Sperma ja laimennusaine (L1) sekoitetaan ja jäähdytetään 5 celsiusasteeseen 30-60 minuutin aikana. Tämän jälkeen lisätään sperman ja L1:n sekaan vielä kerran laimennusnestettä (L2). Seoksen annetaan tasaantua 1-2 tunnin ajan 5 celsiusasteessa. Sitten seos ladataan muovisiin olkiin pakastusta varten. Oljet jäähdytetään nestemäisellä typellä (Caturla-Sánchez 2018). Aluksi olkia pidetään typen höyryssä, 4 cm typen pinnan yläpuolella (-110 astetta) noin 10 minuutin ajan ja sitten oljet kastetaan tyypeen (-196 astetta) pystysuorasti (Bencharifa ym. 2010).

Schäfer-Somi ym. (2006) tutkivat paraneeko pakastetun ja sulatetun sperman laatu, jos sperma sentrifugoidaan, supernatantti poistetaan ja siittiörikkaaseen sakkaan sekoitetaan laimennusneste. Kokeessa ei havaittu, että sentrifugointi olisi parantanut sperman laatua.

Kun omistaja päättää ottaa talteen koiran spermaa, olennaista on eläinlääkärin arviointikyky koskien siittiöiden selviytymistä kylmäsäilytyksestä sekä siittiöiden hedelmöityskyvyn säilymistä pakastuksen jälkeen. (Eilts 2005). Vaikka sperma olisikin laadukasta, lisähaasteen kylmäsäilytykseen tuo sen lisäämä osmoottinen, kemikaalinen ja fysikaalinen stressi siittiöille. Nämä tekijät aiheuttavat siittiöiden kuolemaa ja piileviä vikoja, jotka lyhentävät siittiön elinikää ja heikentävät hedelmöittämisominaisuuksia. Kryokapasitaatiolla tarkoitetaan siittiön kapasitaatiota muistuttavia muutoksia, jotka

saavat alkunsa kylmäsäilytyksestä. Kapasitaatiolla kuvataan tilaa, jossa siittiö kypsyy hedelmöittämiskykyiseksi nartun kohdussa. Kryokapasitaation on todettu tapahtuvan aina pakastetussa spermassa. Pakastuksen aikainen kryokapasitaatio aiheuttaa siittiöille ennen aikaista kypsymistä ja tämän uskotaan oleva yksi syy siittiöiden lyhentyvään elinikään ja huonontuneeseen hedelmöittämiskykyyn (Martínez 2004).

Ihanteellinen sperman konsentraatio pakastusta varten on 200×10^6 siittiötä/ml (Schäfer-Somi ym. 2006). Bencharifa ym. (2010) taas pitivät pakastukseen sopivaa näytteen raja-arvoa 300×10^6 siittiötä/ml (ensimmäisen ja toisen fraktion sekoitus). Rota ym. (2005) pitivät liikkuvuuden suhteen raja-arvona 80% liikkuvuutta.

Siittiön jäätyminen muokkaa solukalvoa ja helpottaa nesteen poistumista solusta (Eilts 2005). Sperman jäädytys ei saa tapahtua liian nopeasti, sillä silloin vettä ei poistu tarpeeksi ja se on riskissä muodostaa jääkiteitä siittiön sisään (Rota ym. 2005). Kylmähokki syntyy, kun siittiö jäädytetään äkisti alle nollaan asteeseen (Holt 2000). Jos siittiön sisälle syntyy jääkiteitä, se kuolee. Liian hidas jäädytyskin on riski, sillä siittiö saattaa kuivua liikaa. (Eilts 2005). Nesteen poistuminen siittiöstä vaikuttaa myös sen ionitasapainoon (Holt 2000).

9.3 Säilytys ja säilyvyys

Jäähdytetyn sperman säilyvyys on usein hyvä, jos sen säilyttää 4 asteessa, siihen on käytetty laimennusnestettä ja sperma on pakattu huolella esimerkiksi kylmäpakattuun styroksilaatikkoon. Näin käsiteltynä jäähdytetty sperma säilyy hedelmöittämiskykyisenä ainakin 12-24 tuntia, usein vielä kauemminkin (Linde-Forsberg 1995). Ponglowhapan ym. (2004) tutkivat siittiöiden elinikää, kun laimennusnesteeseen lisättiin glukoosia tai fruktoosia. Tutkimuksen mukaan siittiön elinikä on ihanteellisissa olosuhteissa jopa 3 viikkoa, tosin sen hedelmöittämiskykyä ei tutkittu. Hedelmöittämiskyky on tutkitusti ainakin kahden päivän pituinen (Ponglowhapan ym. 2004). Jos spermaseosta säilytetään korkeammassa lämpötilassa kuin 4 astetta, voivat bakteerit alkaa kasvaa (Linde-Forsberg 1995).

Pakastetun sperman olkien tai pillereiden säilytys tapahtuu nestemäistä typpeä sisältävässä säiliössä (Linde-Forsberg 1995). Käytännössä koiran spermaa pystytään säilyttämään pakastettuna ikuisuuden ajan (Ponglowhapan ym. 2004).

9.4 Sulatus

Pakastettua spermaa sulatettaessa olki kastetaan vesihauteeseen. Vesihauteen lämpötila ja sulatusaika vaihtelevat eri protokollissa. Yleinen käytetty veden lämpötila sulatuksessa on 70 astetta. Olkea pidetään tässä lämpötilassa 8 s ajan. Toinen vaihtoehto on 35 asteen lämpöinen vesi, jossa olkea pidetään 30 sekunnin ajan (Linde-Forsberg 1995). Sperman sulatus voidaan myös tehdä fysiologisessa suolaliuoksessa tai sulatusliuoksessa (Bailey ym. 2000).

Sulatuksen jälkeen sperma tulee käyttää mahdollisimman nopeasti. Kun spermaa sulatetaan, soluun virtaa nestettä pakastuksessa menetetty määrä, joka aiheuttaa, samoin kuin jäädytyksessä, solukalvolle suuren stressin (Bailey ym. 2000).

10 JÄÄHDYTYKSEN SEKÄ PAKASTUKSEN JA SULATUKSEN VAIKUTUS SPERMAN LAATUUN

Monet seikat vaikuttavat sperman laatuun koko pakastusketjun ajan. Näitä ovat esimerkiksi tekniikka, jolla sperma kerätään, käytetty laimennusneste sekä sulatusprotokolla. Myös yksilöllä on merkitystä pakastesperman laatuun. Joidenkin yksilöiden sperma kestää paremmin pakastusta kuin toisten (Schäfer-Somi ym. 2006). Merkittävimmät muutokset sperman laatuun pakastamisen yhteydessä ovat solun sisään syntyvät jääkiteet, siittiön osmoottisiin tekijöihin ja kylmään liittyvät vauriot sekä pakastamisen vaikutus siittiön pintarakenteeseen ja mahdolliset genomivauriot (Barbas & Mascarenhas 2009).

Usein 40-50 % siittiöistä ei selviä pakastuksesta, vaikka se olisi tehty protokollaa noudattaen (Bailey ym. 2000). Pakastaminen vähentää siittiöiden kokonaisliikkuvuutta ja lisää rakenteellisten vikojen määrää (Kim ym. 2010). Tämän takia on oleellista, että oljet sisältävät niin paljon siittiöitä, että hedelmöittyminen voi onnistua. Siemennys olisi hyvä tehdä kohtuun, jolloin siittiöitä menetetään vähemmän kuin vaginaan siemennettäessä (Bailey ym. 2000).

Kylmäsäilytetty sperma säilyy hyvin ja usein siittiöitä kuolee vain vähän käsittelyn aikana. Jos spermaa säilytetään oikein, 4 asteessa, spermaseoksen liikkuvuus voi olla vielä neljän päivänkin jälkeen 25-75 % alkuperäisestä liikkuvuudesta (Linde-Forsberg 1995).

11 POHDINTA

Koiran sperman laadullisia ja määrällisiä arvoja on tutkittu runsaasti, mutta kuitenkin suuri osa hedelmällisyysongelmien syistä jää selvittämättä. On oletettavissa, että epäonnistuneeseen pentueeseen löytyy yhtä paljon syitä nartusta kuin uroksesta. Tutkimusmenetelmät ovat kehittyneet nopeasti ja uutta dataa saadaan jatkuvasti. Samalla kun tutkimusmenetelmät ovat kehittyneet, myös hoitomenetelmät ja tiineytysmenetelmät kehittyvät. Nykyisin on esimerkiksi mahdollista tutkia sperman laatua koneellisesti (CASA) tai siementää koira sukupuolilajitelulla spermalla. Kun kone tutkii sperman arvoja, tulos on aina objektiivisempi kuin silmämääräinen arviointi.

Urosten siittiöntuotanto on tehokasta. Päivittäin siittiöitä tuotetaan 1-25 miljardin kappaleen väliltä. Normaalissa koiran ejakulaatissa on $300-2000 \times 10^6$ siittiötä (Senger 2003). Kivesten koolla on merkittävä vaikutus päivätuotokseen (Kolster 2018). Isoilla roduilla on suuremmat kivekset ja siten niiden siittiöntuotantokin on runsaampaa, kuin pienten rotujen edustajilla.

Iän vaikutusta siittiöntuotantoon spekuloidaan paljon. Tutkimuksissa (Rijsselaere ym. 2007, Tesi ym. 2018) todettiin iän olevan merkittävä korreloiva tekijä siittiöiden

rakenteellisiin vikoihin. Määrän ja liikkuvuuden ei huomattu merkittävästi muuttuvan iän myötä. Vanhoilla koirilla yleisimpiä havaittuja rakennevikoja ovat keskiosan rakenteelliset viat (Tesi ym. 2018). Näistä yleisimpiä havaittuja vikoja ovat proksimaalipisarot, jotka heikentävät hedelmällisyyttä (Leonardo 2007). Uroksen lisääntymiskyky säilyy siis läpi elämän, mutta uroksen vanheneminen voi vaikuttaa pentuekokoon.

Spermaa kerätään uroskoirilta sperman tutkimisen, keinosiemennyksen tai pakastamisen takia. Sperman laatuun vaikuttaa se, kuinka usein keräys tapahtuu. Liian tiheään tapahtuva keräys vähentää ejakulaatin siittiöiden määrää. Myös ensimmäisillä keräyskerroilla laatu saattaa olla huonompi (Kolster 2018). Keräyshetkellä paikalla tulisi olla narttu, joka on kiimassa. Kiimaisen nartun paikallaolon on todettu parantavan sperman laatua ja määrää (Kutzler 2005). Jos sperman tiheys ja liikkuvuus ovat huonoja tai rakenteellisia vikoja on runsaasti, tulee näytteenotto uusia noin seitsemän päivän päästä (Kolster 2018).

Sperma arvioidaan silmämääräisesti ja faasikontrastimikroskoopilla. Hyvässä näytteessä spermarikasta fraktiota saadaan 0,1-3 ml (England 1990) ja sperman tulisi olla väriltään valkoisen harmahtavaa. Siittiöiden normaali liikkuvuus tulisi olla vähintään 70 %. Normaali liike on nopeaa, tehokasta ja eteenpäin vievää. Epänormaaleja siittiöitä tulee olla korkeintaan 5-15 % siittiöistä (Senger 2003) Toisaalta, vaikka rakenteellisesti viallisia siittiöitä on enemmän kuin 15 %, voidaan vielä saada normaalikoikoinen pentue. Siittiöiden rakenteellisen vian tyypillä on myös merkitystä tiinehtyvyyteen (Leonardo 2007). Leonardon (2007) mukaan rakenteelliset viat jaotellaan lieviin ja vakaviin. Rakenteellisia vikoja voi esiintyä pään, keskikappaleen ja hännän alueella. Ihmisillä sanotaan rakenteellisten vikojen olevan merkittävin indikaattori hedelmällisyyttä arvioidessa.

Geneettiset syyt ovat yksi yleinen syy siittiöiden rakenteellisiin vikoihin ja ongelmat usein periytyvät alenevassa polvessa. Muita syitä ovat muun muassa kivesten lämpöstressi, jonka seurauksena siittiöntuotanto heikkenee. Iatrogeeniset syyt, esimerkiksi pitkäaikainen kortisonin syönti, saattavat aiheuttaa rakenteellisia vikoja siittiöihin. Myös ulkopuoliset stressin aiheut, kuten omistajanvaihdos saattavat saada

aikaan siittiöiden rakenteellisia vikoja (Martínez 2004). Rakenteellisista vioista tiedetään jo paljon, mutta vikojen syitä ja hoitomenetelmiä tutkitaan ja kehitetään jatkuvasti.

Merkittävä vaikutus koiran sperman laatuun on saatu ravintolisillä. Sperman laadun paranemista on tutkittu ainakin rasvahapon, E-vitamiinin, sinkin ja seleenin lisäämisen yhteydessä (Alonge ym. 2019). Tosin Risso ym. (2016) huomasi kalaöljyn laskevan testosteronitasoja koiran seerumissa. Tämä on hieman ristiriitaista, sillä testosteronia tarvitaan spermatogeneesissä. Tutkimuksen aikana kalaöljyä syöneiden koirien siittiöiden kokonaismäärä ja liikkuvuus kuitenkin nousivat ja rakenteelliset viat vähenivät.

Sperman pakastaminen on monessa mielessä hyvä ja arvokas asia. Sillä saadaan vietyä jalostusta eteenpäin, säilytettyä geneettistä materiaalia tuleville sukupolville ja pidettyä harvinaisten lajien ja rotujen geenipooli laajempaan (Freshman 2002). Täysin ongelmattomasti sperman pakastus ei tosin ole. Pakastus aiheuttaa siittiöihin vaurioita, muun muassa suurta kuolleisuutta (Martínez 2004). Jäähdytetty sperma taas ei säily pitkään ja vaatii aina usean henkilön yhteistyön (muun muassa keräävän ja siementävän eläinlääkäriin), mutta koska keräys voidaan tehdä jo hyvissä ajoin, ei se aiheuta niin suurta vaivaa. Tuoreella spermalla siementäessä tulee huomioda, että jos siemennyshetki ajoittuu viikonloppuun tai pyhään, on keräävä ja siementävä eläinlääkäri oltava tiedossa hyvissä ajoin. Koiran sperman pakastus ja jäähdytys keinosiemennystä varten vaatii aina sperman laadun tutkimisen (Fresman 2002). Ilman laadun tutkimista voi esimerkiksi kallis pakastus tai jäähdytetyn sperman lähetys olla turhaa. Myös laimennusnesteiden valinnalla on merkitystä. Oikealla laimennusnesteellä saadaan lisää aikaa jäähdytetyn sperman kuljettamiseen ja siemennyksen oikean ajankohdan valintaan.

Siemennettäessä kohtuun pakastetulla spermalla suositellaan siittiöiden määräksi $150\text{--}200 \times 10^6$ (Martínez 2002). Pakastuksen jälkeisessä koesulatuksessa tutkitaan siittiöiden liikkuvuutta. Koesulatuksen mukaan määritetään, kuinka monta olkea käytetään siemennykseen. Kohtuun siemennettäessä pienemmilläkin annoksilla on saatu tiineyksiä aikaan. Siemennys pakastetulla spermalla tulisi tehdä kohtuun, kun narttu on ovuloinut 2-5 vuorokautta sitten. Jos kahdesti siementäminen on mahdollista, tulisi siemennys uusia kahden päivän päästä (Linde-Forsberg 1995). Tosin nykyisin on

yleisempää, että siemennys tapahtuu peräkkäisinä ovulaation jälkeisinä päivinä 3 ja 4 (Hollinshead & Hanlon 2017). Siittiö ei pysy hengissä kohdussakaan kovin kauan sulatuksen jälkeen (Linde-Forsberg 1995).

Vaginaan siemennettäessä suositellaan oljessa olevan 200×10^6 liikkuvaa siittiötä (Martínez 2002). Jos siittiöiden laatu on heikentynyt ja liikkuvuus on huonontunut, suositellaan siemennyksen tekemistä suoraan kohtuun. Usein vaginaalinen siemennys tehdään tuorespermalla tai jäädytetyllä spermalla (Linde-Forsberg 1995).

Useita eri hedelmällisyysongelmia pystytään tänä päivänä hoitamaan ja jälkeläisiä voidaan saada aikaan myös niille uroksille, jotka eivät saisi aikaan tiineyttä luonnollisesti astumalla. Vaikka jalostusmenetelmät kehittyvät, tulisi pitää mielessä eläimen terve rakenne. Jalostuksessa tulisi käyttää vain koiraa, joka pystyy lisääntymään myös ilman ihmisen apua.

Tämän lisensiaatin tutkielman tarkoitus oli koota tietoa koiran spermasta ja sen laadusta. Tutkielman kirjallisuuskatsaus kattaa monipuolisesti ja laajasti aihealuetta käsitteleviä tämänhetkisiä tutkimuksia ja tutkimustuloksia. Aiheen laajuuden vuoksi ei voitu syventyä tarkemmin jokaiseen sperman laatuun vaikuttavaan osa-alueeseen. Tätä lisensiaatin tutkielmaa olisi mahdollista lähteä jatkamaan kokoamalla kattavammin tietoa esimerkiksi siittiöiden rakennevioloista. Lääketiede on koko ajan kehittyvä ja muuttuva ala, minkä vuoksi tätä tutkielmaa käyttäessä tulee ottaa huomioon tiedon vanheneminen.

Monet arvot, jotka käsittelevät sperman jäädytystä, pakastusta, sulatusta ja siemennystä, on määritelty usein henkilökohtaisen kokemuksen mukaan. Käytäntöjen yhdistäminen ja päivittäminen voisi saada aikaan tehokkaampia ja toimivampia menetelmiä sperman käsittelyyn.

12 LÄHTEET

Ahlstrøm O, Biagi G, Dobenecker B, Hendricks Hesta M, Iben C, Nguyen P, Paragon B, Villaverde C, Zentek J. Nutritional Guidelines For Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, FEDIAF. Bryssel, Belgia, 2018. Liite löytyy osoitteesta: <http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition.html> (haettu 13.3.2019).

Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction —A review. *Anim Reprod Sci* 2014, Vol. 146 No. 1-2: 55-62.

Alonge S, Melandri M, Leoci R, Lacalandra GM, Caira M, Aiudi GG. The Effect of Dietary Supplementation of Vitamin E, Selenium, Zinc, Folic Acid, and N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Sperm Motility and Membrane Properties in Dogs. *Animals* 2019, 9: 34.

Amjad S, Baig M, Zahid N, Tariq S, Rehman R. Association between leptin, obesity, hormonal interplay and male infertility. *Andrologia* 2019, 51: 131-147.

Arantes TP, Lopes WDZ, Ferreira RM, Pieroni JSP, Pinto VMR, Sakamoto CA, Costa AJ. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Exp Parasitol* 2009, Vol. 123, No. 2: 190-194.

Bailey JL, Bilodeau J-F, Cormier N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *J Androl* 2000, Vol. 21 No. 1: 1-7.

Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009, 10:49–62.

Bencharifa D, Amirat-Brianda L, Garanda A, Antonb M, Schmittc E, Deshercesc S, Delhomme G, Langloisd M-L, Barrière P, Destrumellea S, Vera-Munoza O, Tainturiera D. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci* 2010, 119: 305-313.

Benedetto de Carvalho CM, Rodrigues Santos F. Human Y-chromosome variation and male dysfunction. *J mol genet med* 2005, Vol. 1 No. 2: 63-75.

Boersma A, Rasshofer R, Stolla R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reprod Domest Anim* 2001, 36: 222-229.

Caturla-Sánchez E, Sánchez-Calabuig MJ, Pérez-Gutiérrez JF, Cerdeira J, Castaño C, Santiago-Moreno J. Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology* 2018, Vol. 80: 126–129.

Chemes HE. Phenotypes of Sperm Pathology: Genetic and Acquired Forms in Infertile Men *J Androl* 2000, Vol. 21, No. 6.

Chemes HE. Phenotypic varieties of sperm pathology: Genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 2018, 194: 41-56.

Dahlblom M, Johnsson M, Myllys V, Taponen J, Andersson M. Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems. *Reprod Domest Anim* 2009, 44: 128-144.

Dalmazzo A, Losano JDA, Rocha CC, Tsunoda RH, de Souza Ramos Angrimani D, Mendes CM, D'Ávila Assumpção EO, Nichi M, Barnabe VH. Effects of Soy Lecithin Extender on Dog Sperm Cryopreservation. *Anim Biotec* 2018, Vol. 29 No. 3: 174-182.

Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otzdorff C. Sperm membrane integrity in fresh and frozen–thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the NucleoCounter SP-100. *Theriogenology* 2016, 86: 651-656.

Domosławska A, Jurczak A, Janowski T. Oral folic acid supplementation decreases palate and/or lip cleft occurrence in Pug and Chihuahua puppies and elevates folic acid blood levels in pregnant bitches. *Pol J Vet Sci* 2013, 16: 33-37.

Domosławska A, Zdunczyk S, Franczyk M, Kankofer M, Janowski T. Selenium and vitamin E supplementation enhances the antioxidant status of spermatozoa and improves semen quality in male dogs with lowered fertility. *Andrologia* 2018, 50: e13023.

Domosławska A, Zduńczyk S, Jurczak A, Janowski T. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from prostatic fluid as an infertility factor in a male dog. *Andrologia* 2017, 49: e12769.

Eilts BE. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology* 2005, 64: 685–691.

Eläintensuojelulaki 247/1996. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1996/19960247>, haettu 23.2.2019.

England GC, Allen WE. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 1992, Vol. 37 No. 2: 373-381.

England GC, Allen WE, Middleton DJ. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Res Vet Sci* 1990, Vol. 49 No. 1: 66-70.

Fijak M, Pilatz A, Hedger MP, Nicolas N, Bhushan S, Michel V, Tung KSK, Schuppe H-C, Meinhardt A. Infectious, inflammatory and ‘autoimmune’ male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update* 2018, Vol. 24, No. 4: 416–441.

Fontbonne A. Infertility in male dogs: recent advances. *Rev Bras Reprod Anim* 2011, Vol. 35, No. 2: 266-273.

Freshman JL. Semen Collection and Evaluation. *Clin Tech Small An P* 2002, Vol. 17, No 3: 104-107.

Garner DL, Seidel Jr. GE. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Anim Sci* 2003, 83: 375-384.

Goodnow CC. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Cell* 2007, Vol. 130 No. 1:25-35.

Graham EM, Taylor DJ. Bacterial Reproductive Pathogens of Cats and Dogs. *Vet Clin Small Anim* 2012, 42: 561–582.

Hollinshead FK, Hanlon DW. Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 2017, 101: 62-72.

- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000, 62:3-22.
- Johnson CA. Thyroid issues in reproduction. *Clin Tech Small An P* 2002, Vol. 17, No 3: 129-132.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod sci* 2000, Vol. 60-61: 93-107.
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology* 2019, 126: 41-48.
- Keid LB, Diniz JA, Oliveira T, Ferreira HL, Soares RM. Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. *Reprod Dom Anim* 2015, 50: 939–944.
- Kim S-H, Yu D-H, Kim Y-J. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology* 2010, 73: 282-292.
- Kolster KA. Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. *Vet Clin Small Anim* 2018, 48: 533–545.
- Krecic MR. Antibodies produced by dogs successfully challenged with live *Leptospira* spp. did not cross-react to *Brucella* antigen in a commercial rapid slide agglutination test that detects antibodies to *Brucella canis*. *J Vet Diagn Invest* 2019, Vol. 31(1): 83–85.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49:112–117.
- Kutzler MA. Semen collection in the dog. *2005 Theriogenology* 2005, 64: 747–754.
- Leonardo FC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clin Tech Equine Pract* 2007, 6:249-264.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003, Vol. 79 No. 1: 212-215.

- Linde-Forsberg C. Artificial Insemination With Fresh, Chilled Extended, and Frozen-Thawed Semen in the Dog. *Semin Vet Med Surg*, 1995 Vol 10, No 1: 48-58.
- Makloski CL. Canine Brucellosis Management. *Vet Clin Small Anim* 2011, 41: 1209–1219.
- Martínez P. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 2004, 82–83: 209–224.
- Memon MA. Common causes of male dog infertility. *Theriogenology* 2007, 68: 322–328.
- Meyers-Wallen VN. Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *J Rep Fer S* 1993, 47: 441-452.
- Nelson RW, Couto GC. *Small Animal Internal Medicine* 5. St. Louis, Missouri, 2014: 915-943.
- O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan R, Stanton PG. Spermiation. *Spermatogenesis* 2011, 1: 14-35.
- Ohl DA, Denil J, Cummins C, Menge AC, Seager SWJ. Elektroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of elektroejakulation and collection by artificial vagina. *J Urology* 1994, 152: 1034-1037.
- Oliveira ECS, Juliani GC, Marques Jr. AP, Henry M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006, Vol. 58, No. 6: 1116-1122.
- Ponglowhapan S, Esse'n-Gustavsson B, Linde Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 2004, 62: 1498-1517.
- Reimann-Berga N, Escobara HM, Nolteb I, Bullerdiek J. Testicular tumor in an XXY dog. *Cancer Genet Cytogen* 2008, 183: 114-116.
- Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G, de Kruif A. and Van Soom A. Effect of Body Weight, Age and Breeding History on Canine Sperm Quality Parameters Measured by the Hamilton-Thorne Analyser. *Reprod Dom Anim* 2007, 42: 143–148.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2004, 61:1589–1602.

Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 2005, 64: 706-719.

Risso A, Pellegrino FJ, Relling AE, Corrada Y. Effect of Long-Term Fish Oil Supplementation on Semen Quality and Serum Testosterone Concentrations in Male Dogs. *Int J Fertil Steril* 2016, Vol. 10 No 2: 223-231.

Rota A, Rota A, Martini M, Milani C, Romagnoli S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 2005, 45: 29-37.

Ruokavirasto. Bakteerien aiheuttamat taudit. Bruselloosi. <https://www.ruokavirasto.fi/teemat/zoonosikeskus/zoonoosit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/bruselloosi/> Haettu 19.3.2019.

Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 2006, 66: 173–182.

Seager SWJ, Platz CC, Fletcher WS. Conception rates and related data using frozen dog semen. *F Reprod Fert* 1975, 45:189-192.

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition 2. p. Current Conceptions Ink. Pullman, Washington Yhdysvallat 2003.

Shang X, Shen C, Lu J, Tang L, Zhang H, Wang Y, Wu W, Chi J, Zhuang H, Fei J, Wang Z. Serine protease PRSS55 is crucial for male mouse fertility via affecting sperm migration and sperm-egg binding. *Cell Mol Life Sci* 2018, 75: 4371-4384.

Smyth CM, Bremner WJ. Klinefelter Syndrome. *Arch Intern Med* 1998, 158(12):1309-1314.

Stănescu M, Bîrțoiu AI. Freezing of dog's sperm: a review. *Rom Biotech Lett* 2012, Vol. 17 No. 5: 7709-7716.

Stornelli A, Arauz M, Baschard H, de la Sota R-L. Unilateral and Bilateral Vasectomy in the Dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency. *Reprod Dom Anim* 2003, 38: 1–4.

Tesi M, Sabatini C, Vannozzi I, Di Petta G, Panzani D, Camillo F, Rota A. Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study. *Theriogenology* 2018, 118: 34-39.

Toppari J, Huhtaniemi I. Kives. *Lääketieteellinen aikakauslehti Duodecim* 1999, 115: 1853-1860.

Van den Berghe F, Paris MCJ, Briggs MB, Farstade WK., Paris DBBP. A two-step dilution tris-egg yolk extender containing Equex STM significantly improves sperm cryopreservation in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Cryobiology* 2018, 80: 18-25.

Varesi S, Vernocchi V, Faustini M, Luvoni GC. Quality of canine spermatozoa retrieved by percutaneous epididymal sperm aspiration. *J Small Anim Pract* 2012, 54: 87-91.

Wallock L, Jacob R, Woodall A, Ames B. Nutritional status and positive relation of plasma folate to fertility indices in nonsmoking men. *Fed Am Soc Exp Biol J* 1997, 11: 184.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 5. painos. Cambridge, UK: Cambridge University Press 2010.

Yule TD, Tung KS. Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology* 1993, Vol. 133, No. 3, 1: 1098–1107.